

Singapore PATENTS ACT 1994

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Felicia Marchardt of A-1010 Vienna, Riemergasse 14, hereby declare as follows:

1. I am translator and am familiar with both the English and German languages.
2. I am the translator of the document attached hereto and certify that the following is a true translation of the priority application A 1635/99 of the PCT Application No. PCT/AT00/00252, to the best of my knowledge and belief.

Dated this 12<sup>th</sup> day of April 2005

Felicia Marchardt

Signature

The invention relates to the use of Alprostadil for preparing a medicament for angiogenesis.

Cardiomyopathy (CMP) is a disease which leads to an enlargement of the heart muscle and to myocardial insufficiency. From the myocardial insufficiency there results a reduced pumping function and ejection action of the heart. The pathogenesis of the dilated cardiomyopathy is still unknown. Ischemic cardiomyopathy may be a consequence of myocardial infarction(s), since the necrotic heart muscle areas are replaced by connective tissue. However, this heart muscle substitute of connective tissue cannot carry out any cardiac functions. There follows a reduction in the heart muscle function and water accumulation in the lungs and in the lower extremities. The consequence are severe shortness of breath, lack of stress endurance and fatigue.

Due to the myocardial insufficiency, the diagnosis of this disease is based on the typical clinical symptoms, such as general weakness, lacking stress endurance of the body, short breath under stress and at rest, recurrent pulmonary oedema as well as a deterioration of the laboratory parameters with a pathological rise in the parameters of the kidneys and of the liver and an impaired electrolyte metabolism. The echocardiograph shows an enlarged heart with reduced ejection as well as an inhomogeneous contraction pattern. The case history of patients suffering from dilated CMP shows no myocardial infarction, and no (effective) coronary sclerosis is found in the coronary angiography.

Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) is a medicament which originally was used in the treatment of newborn babies with (anatomical) cardio-pulmonary malformations because of its good vasodilating effect. Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) is further used to a limited extent in case of chronic-erectile dysfunction.

In EP 0 153 858 A2, the use of prostaglandins (among them also prostaglandin E<sub>1</sub>) has been described for the treatment of multiple organ defects, acute respiratory distress syndrome (ARDS; shock lung), shock trauma or sepsis.

Forth et al. ("Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7<sup>th</sup> edition (1996), p. 344, column 1, 2<sup>nd</sup> paragraph) exclusively list the known vasodilating effect of prostaglandin E<sub>1</sub> in which the haemodynamic parameters regarding this hitherto only indication for which there exists a market authorization

have been described.

Rabinowitz et al. (Am.J.Ther. 4 (11/12) (1997), pp. 353-358) describe the haemodynamic effect of prostaglandin E1 on patients with coronary heart disease with stable and instable Angina pectoris, who have undergone an intervention with PTCA (hearth catheter with balloon dilation) or bypass surgery or have suffered from an acute myocardial infarction. Furthermore, an increase in the skin temperature after the application of prostaglandin E1 in patients with peripheral arterial occlusive disease has been found.

Wimmer et al. (Jpn Heart J. 40(3) (1999), pp. 321, 334) report the expression of neurohumoral mediators in prostaglandin E1 therapy as compared to dobutamine in patients with chronic cardiac insufficiencies. This study shows a better hemodynamic effect of the group treated with prostaglandin E1 as compared with the dobutamine-treated group. Moreover, the renal function was assayed by way of the paraaminohippurate clearance as well as iothalamate clearance, with the patients of the prostaglandin group exhibiting the better renal values.

In the article by Meyer et al. (Anesth. Analg. 86 (1998), pp. 753-358), the hemodynamic effect of prostaglandin E1 in a form to be inhaled, combined with NO gas was evaluated in patients suffering from multiple organ failure, an improvement in these parameters occurring with the therapy form applied.

Sterling et al. (Liv.Transp.Surg. 4(5) (1998), pp. 424-431) disclose the treatment of patients suffering from acute liver failure, it being shown as unclear whether prostaglandin E1 has any effect if this therapy is started within 10 days. It is, however, pointed out that the results showed that prostaglandin E1 had no effect if the treatment was started only 10 days after the onset of the clinical symptoms. Accordingly, from the authors' viewpoint, prostaglandin E1 is not suitable for the treatment of acute liver failure (fulminant hepatic failure (FHF)).

Finally, Iwata et al. (J.Gast.Hepatol. 14(1999), pp.634-641) describe animal tests in which prostaglandin E1 was directly infused in liver veins. Serologically, the prostaglandin E1-treated group exhibited more leucocytes. Therefore, it is concluded that microcirculatory damage associated with ischemia and reperfusion caused by the inhibition of leucocyte endothelium-

interactions can be treated by hepatic perfusion with prostaglandin E1.

The present invention had as its object to provide a new use of Alprostadil (prostaglandin E1) which is not based on its vasodilating activity.

This object has been achieved by using Alprostadil for preparing a medicament for angioneogenesis. Further special applications of the angioneogenesis according to the invention are described in claims 2 to 12. In view of the known effects of prostaglandin E1, the effect provided according to the invention of Alprostadil on angioneogenesis was completely surprising. It has been shown that patients suffering from chronic cardiac insufficiency could successfully be treated just as patients with advanced peripheral arterial occlusive diseases, diabetic angiopathy as well as systemic lung diseases and acute or chronic renal or hepatic insufficiency as well as glomerulonephritis. Furthermore, also necrotic heart areas, in particular following cardiac infarction, could be revitalized. Consequently, the inventive use is also possible in patients suffering from cerebral infarction (infarction of the brain). In any event, this is due to the fact that other functional processes than vasodilation are responsible for this effect, e.g. a more efficient supply of the myocytes with oxygen by an increased blood supply. Since the latter depends on the vessels and capillaries existing, a neovascularisation in the treated patients would be a prerequisite for an increase in the blood supply after an infusion therapy of prostaglandin E1. This could also impressively be demonstrated within the scope of the present invention by determining the vessel density.

From the results shown in more detail in the Examples, it becomes apparent that surprisingly a neovascularisation and, thus, an improved blood supply of the organs exists in the Alprostadil-treated patients.

In contrast to common teachings, the Alprostadil therapy used according to the invention apparently led to

- a) formation of new capillaries and improvement in the blood supply of organs,
- b) reduction of the pathological fibrosis level,
- c) formation of tunnel capillaries,
- d) regression of the muscle hypertrophy in chronic cardiac in-

sufficiency,

- e) neovascularisation accompanied by an increased VEGF production, in which probably also other growth factors, such as TFGb, PDGF, FGF, are involved;
- f) elevation of the cardiac index in chronic cardiac insufficiency;
- g) increase in the ejection action in chronic cardiac insufficiency;
- h) flushing out of lung edemas in chronic cardiac insufficiency;
- i) lowering of elevated pressures in the lesser circulation (pulmonary circulation) in chronic cardiac insufficiency;
- j) stabilisation of the blood pressure in chronic cardiac insufficiency;
- k) improvement in the shortness of breath and regression of the NYHA stage;
- m) decrease in the muscular hypertrophy in CMP and hypertension-caused cardiomyopathy.

In the drawings, Fig. 1 shows CD-34-positive capillaries in the subepicardium (Subepi), myocardium (Myocard) and subendocardium (Subendo) in Alprostadil (PGE1)-treated patients in comparison with the control group; Fig. 2 shows vWF-positive capillaries in the subepicardium (Subepi), myocardium (Myocard) and subendocardium (Subendo) in the Alprostadil(PGE-1)-treated patients in comparison with the control group; Fig. 3 shows MIB-1-positive endothelial cells in the subepicardium (Subepi), myocardium (Myocard) and subendocardium (Subendo) in Alprostadil(PGE 1)-treated patients in comparison with the control group; Fig. 4 shows VEGF-positive capillaries in the subepicardium (Subepi), myocardium (Myocard) and subendocardium (Subendo) in Alprostadil(PGE-1)-treated patients in comparison with a control group; and Fig. 5 shows the degree of fibrosis in Alprostadil(PGE 1)-treated patients in comparison with the control group.

The invention will be explained in more detail by way of the following Examples and the drawing figures to which, however, it shall not be restricted.

#### Examples :

##### 1. Clinical Study on Patients with CMP

Patients suffering from CMP were signed up for a heart

transplantation (HTX) and received a drug treatment with ACE inhibitors,  $\beta$ -blockers, diuretics and digitalis.

In a preceding study, several patients suffering from cardiomyopathy, among them 9 patients suffering from dilated CMP, additionally received an Alprostadil(PGE1) infusion therapy prior to an HTX.

The criteria for inclusion in the Alprostadil(PGE1) study were:

- a. Patients severely restricted in their daily activities, even though they received a maximum oral drug treatment with ACE inhibitors (angiotensin-converting enzyme antagonists), diuretics and digitalis.
- b. The hemodynamics of the patients exhibited a low cardiac index ( $< 2.5 \text{ l/min/m}^2$ ) and a higher PCWP (pulmonary capillary wedge pressure)  $> 20 \text{ mm Hg}$ .
- c. CMP-patients who exhibit an increased peripheral vascular resistance.

Alprostadil (PGE1) does not belong to the standard therapy of cardiomyopathy, yet because of its good vasodilating activity in patients afflicted with cardiomyopathy and an increased peripheral vascular resistance it was used as an adjuvant therapy to relieve the heart until a heart transplantation was carried out.

The infusion therapy was effected with a current measurement of the hemodynamic parameters. A marked improvement of the hemodynamic parameters was shown in comparison with the starting values, with a simultaneous improvement in the clinical symptoms. In this clinical-experimental study, the Alprostadil(PGE1) infusion therapy was employed in patients in the final stage of cardiac insufficiency as an adjuvant therapy until HTX. Interestingly, in this group of patients a marked improvement in the clinical condition with an increase in the ejection action and of the cardiac output combined with a reduction of the NYHA stage as well as of the pathological pressures in the lung circulation were diagnosed.

The Alprostadil (PGE1) infusions were effected via a central right ventricular catheter (Hickman catheter) with an initial dose of  $2.5 \text{ ng/kg/min}$  which was then increased up to the maximum tolerated dose (MTD). MTD was that dose at which one of the following side effects occurred: myalgia, ostalgia, a drop in blood pressure, nausea, vomiting, diarrhoea, headache or other side

effects. Under MTD ( $29 \pm 1$  ng/kg/min) the hemodynamic parameters were documented. In the following 12 hours the MTD was halved, and after stabilisation of the hemodynamics, the therapy was continued at home with a portable pump.

To answer the question whether the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) infusion therapy is accompanied by neovascularisation, after HTX the explanted hearts from patients with a previous Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) infusion therapy and from patients without Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) therapy were immunohistochemically examined, and the capillary densities were compared.

Each explanted heart was divided into three pieces of equal size, i.e. into tip, middle and basal parts. The section was effected transmurally through the middle part of the left ventricle. Immediately after removal, the tissue for the immunohistochemical analyses was preserved in formaldehyde according to the usual method.

The capillary density was separately determined in the subepicardium, myocardium and subendocardium. The determination of the capillary density  $1 \text{ mm}^2$  was separately carried out by means of anti-CD34, von Willebrand factor (vWF), vascular-endothelial growth factor (VEGF), anti-Ki 67 (MIB 1) and Sirius red-immunohistochemically stained paraffin sections.

### Results

The hemodynamic parameters before the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) therapy were clearly worse in the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) group than in the control group with a comparable mean age ( $52.33 \pm 11.89$  versus  $49.88 \pm 20.42$  years,  $p = 0.76$ ). The patients of the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) therapy had a remarkably lower cardiac index (CI) ( $1.64 \pm 0.29$  l/min/m<sup>2</sup> versus  $2.39 \pm 0.26$  l/min/m<sup>2</sup>,  $p < 0.0001$ ), and a higher pulmonary vascular resistance index (PVRI) ( $605.11 \pm 149.80$  dyn x sec x cm<sup>-5</sup> x m<sup>-2</sup> versus  $372.75 \pm 84.63$  dyn x sec x cm<sup>-5</sup> x m<sup>-2</sup>,  $p = 0.0015$ ). Apart from the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) therapy, both groups received a comparable drug treatment.

The capillary densities in the subepicardium, myocardium and subendocardium of transmural sections were quantified and compared. Patients who received Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) infusions clearly had more capillaries ( $p < 0.001$ ) per mm<sup>2</sup> than the control group. The capillary densities in the subepicardium, myocardium and subendocardium of the control group were  $608.56 \pm 91.32$  ca-

pillaries/mm<sup>2</sup> (sEpi), 542.44 ± 197.20 capillaries/mm<sup>2</sup> (sEndo) and 452.22 ± 101.99 capillaries/mm<sup>2</sup> (Myo) in the three transmural areals. With 1168.11 ± 165.04 capillaries/mm<sup>2</sup> (sEpi), 1066.00 ± 94.63 capillaries/mm<sup>2</sup> (sEndo) and 974.56 ± 87.12 capillaries/mm<sup>2</sup> (myocard), the Alprostadil(PGE1)-treated patients by comparison had approximately 50% more capillaries than the control group.

Examination with regard to specific immunohistochemical capillary markers:

**CD 34**, endothelial cell marker

CD 34 is expressed by all endothelial cells in normal tissue. CD 34 is also used to detect endothelium or endothelial cells, respectively. Following an Alprostadil (PGE 1) therapy, patients had markedly more anti-CD34 reactive endothelium (Fig. 1) than the control group (subepicardium: 599.22 ± 107.17 mm<sup>2</sup> versus 322.89 ± 160.64 mm<sup>2</sup> cells, p <0.001; myocardium: 482.11 ± 79.86 mm<sup>2</sup> vs. 227.22 ± 49.30 mm<sup>2</sup>, p <0.0001; subendocardium: 482.11 ± 79.86 mm<sup>2</sup> versus 227.22 ± 49.30 mm<sup>2</sup>, p <0.0001); subendocardium: 551.67 ± 107.74 mm<sup>2</sup> versus 308.56 ± 193.86 mm<sup>2</sup>, p <0.01).

Factor VIII related antigen, von Willebrand Factor (vWF)

As the second pan-endothelial cell-specific marker, factor VIII was immunohistochemically examined. Following Alprostadil (PGE1) infusion therapy, the hearts from CMP patients showed remarkably more anti-vWF-reactive endotheliums (Fig. 2) as compared to the control group (subepicardium: 425.56 ± 134.17 mm<sup>2</sup> versus 192.22 ± 77.88 mm<sup>2</sup> cells, p <0.001; myocardium: 360.00 ± 52.31 mm<sup>2</sup> versus 159.89 ± 61.00 mm<sup>2</sup> p <0.0001; subendocardium: 408.00 ± 80.00 mm<sup>2</sup> versus 163.89 ± 47.52 mm<sup>2</sup>, p <0.0001).

**MIB-1** (proliferation marker)

MIB-1 (anti-Ki67) is an antibody that only reacts with cells which are not in the G0 phase of the cell cycle, and it is usually used as a mitosis or proliferation marker. With mitotic cells, it exhibits a characteristic reaction.

In the group of patients with Alprostadil(PGE1) infusion therapy, the number of the MIB-1-positive cells (Fig. 3) in all the layers of the heart muscle was markedly higher as compared to the control group: (subepicardium: 20.22 ± 4.87 per mm<sup>2</sup> versus 8.11 ± 2.67 per mm<sup>2</sup>, p <0.0001; myocardium: 15.44 ± 4.64 per mm<sup>2</sup> versus 5.78 ± 2.11 per mm<sup>2</sup>, p <0.0001; subendocardium: 17.84 ± 4.23 per mm<sup>2</sup> versus 6.89 ± 2.21 per mm<sup>2</sup>).



#### Anti-VEGF immunoreactivity of capillaries

VEGF is described as a specific growth factor for endothelial cells. Alprostadil (PGE<sub>1</sub>)-treated patients exhibited remarkably more VEGF-positive capillaries/mm<sup>2</sup> than the control group (Fig. 4) on all three examined section levels (subepicardium:  $101.2 \pm 5.5/\text{mm}^2$  versus  $38.1 \pm 7.2$ -VEGF-positive cells/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.0001$ ; myocardium  $76.2 \pm 4.9/\text{mm}^2$  versus  $20.6 \pm 4.9/\text{mm}^2$ ,  $p < 0.0001$ ; subendocardium:  $89.1 \pm 5.7/\text{mm}^2$  versus  $27.8 \pm 5.1/\text{mm}^2$ ,  $p < 0.0001$ ).

Thus, it has been proven that - in contrast to common teachings - the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) therapy leads to a neovascularization of the heart in patients afflicted with CMP. These properties recommend the Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) therapy as standard therapy in patients suffering from chronic cardiac insufficiency and cardiomyopathy.

#### Fibrosis and muscular mass (Sirius red-staining)

The determination of the degree of fibrosis and of the myocardial portion in Alprostadil(PGE<sub>1</sub>)-treated patients (Fig. 5) versus the control group showed that the Alprostadil(PGE<sub>1</sub>) infusion therapy clearly reduces the degree of fibrosis in patients suffering from dilated CMP ( $15.35 \pm 10.32\%$  versus  $6.89 \pm 3.59\%$ ,  $p < 0.05$ , with a comparable myocardial portion ( $72.69 \pm 5.25\%$  versus  $68.75 \pm 6.23\%$ ).

Claims:

1. The use of Alprostadil for preparing a medicament for angioneogenesis.
2. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is employed within the scope of the treatment of chronic cardiac insufficiency and/or cardiomyopathy.
3. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is employed within the scope of a neovascularisation.
4. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used to lower the degree of fibrosis.
5. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for the regression of hypertrophy.
6. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is for revitalizing necrotic heart regions, in particular following cardiac infarction.
7. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for treating advanced-stage peripheral arterial occlusive diseases.
8. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for treating diabetic angiopathy.
9. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for treating systemic lung diseases, in particular pulmonary fibrosis.
10. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for the treatment of acute or chronic renal insufficiency as well as glomerulonephritis.
11. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for treating acute or chronic hepatic

insufficiency.

12. The use according to claim 1, characterised in that the angioneogenesis is used for the treatment of brain infarction.

DA/R

Abstract:

Described is the use of Alprostadil for preparing a medication for angioneogenesis.

(Fig. 1)

案號：	國外相應案： <input type="checkbox"/> 見申請書 <input type="checkbox"/> 其他：		
中說份數：	<input type="checkbox"/> 改中文 Title	<input type="checkbox"/> 細則 §17 但書	字數：
<input checked="" type="checkbox"/> 原文說明書檔名：p:\Foreign Spec\			-filing 存檔人：
譯者：	寄稿者：	代表圖：	化學式：

附件另存P:\PUB. P \MAIL-IN\Y37209-2005-04-12-Engl.-translation of priority appln. pdf



PCT/AT 00 / 00252

**ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT**

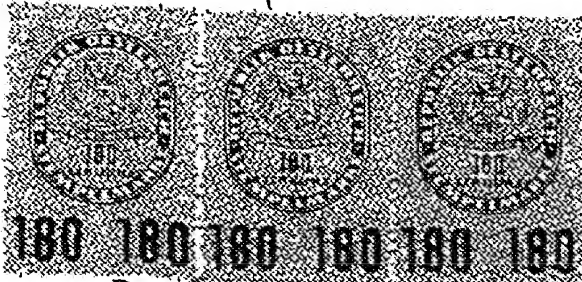
AT 60/252 A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 - 10

NOV 21 2000

WIPO

PCT

4



Aktenzeichen A 1635/99

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**Dr. Mehrabi Mohammad Reza**  
in A-1160 Wien, Gaullachergasse 18/7,

am **24. September 1999** eine Patentanmeldung betreffend

**"Arzneimittel zur Behandlung der Herzkrankheiten",**

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

Es wurde beantragt, Dr. Mehrabi Mohammad Reza in Wien, als Erfinder zu nennen.

Österreichisches Patentamt  
Wien, am 4. Oktober 2000

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident

i. A.



**HRNCIR**  
Fachoberinspektor



STERREICHISCHES PATENTAMT  
Verwaltungsstellen-Direktion

...260,- s 18,89..... €

Kanzleigebluhr bezahlt.

*Ballaun*

51 Int. Cl. :

AT PATENTSCHRIFT

11 Nr.

(73) Patentinhaber: Dr. Mehrabi Mohammad Reza

(54) Gegenstand: Arzneimittel zur Behandlung der  
Herzkrankheiten

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(66) Umwandlung aus GM

(62) Ausscheidung aus :

(22) (21) Angemeldet am:

(30) Priorität :

(42) Beginn der Patentdauer :

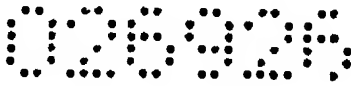
Längste mögliche Dauer :

(45) Ausgegeben am :

(72) Erfinder: Dr. Mehrabi Mohammad Reza

(60) Abhängigkeit :

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht  
gezogen wurden:



**Dr. Mohammad Reza MEHRABI**

**A-1160 Wien, Gaullachergasse 18/7, Tel / Fax: 407 14 13**

**Titel:**

**Verwendung von Alprostadil (Prostaglandin E 1) zur Behandlung von chronischer Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie**

**Defenition der Krankheit**

Cardiomyopathie (CMP) ist eine Krankheit die zur Vergrößerung des Herzmuskels und zu Herzmuskelschwäche führt. Aufgrund der Herzmuskelschwäche kommt es zu einer verminderten Pumpfunktion und Auswurffraktion des Herzens. Die Pathogenese der dilatativen Cardiomyopathie ist nach wie vor unbekannt. Die ischämische Cardiomyopathie kann auf Myokardinfarkt(e) zurückzuführen sein, da die abgestorbenen Herzmuskelareale durch Bindegewebe ersetzt werden. Dieser Herzmuskeleratz aus Bindegewebe kann jedoch keine kardialen Funktionen ausführen. In Folge kommt es zu einer Reduzierung der Herzmuskelfunktion und zur Wasseransammlung in der Lunge und in den unteren Extremitäten. Die Folgen sind starke Atemnot, Unbelastbarkeit und Müdigkeit.

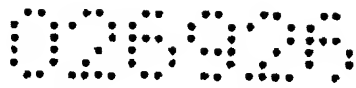
**2. Stand der Diagnose**

Die Diagnose diese Krankheit besteht aufgrund der Herzmuskelschwäche aus der typischen klinischen Symptomatik wie allgemeine Schwäche, körperliche Unbelastbarkeit, Atemnot unter Belastung und in Ruhe, rezidivierenden Lungenödem sowie Verschlechterung der Laborparameter mit pathologischem Anstieg der Nieren- und Leberparameter und einem gestörten Elektrolythaushalt. Echokardiographisch zeigt sich ein vergrößertes Herz mit reduziertem Auswurf sowie inhomogenem Kontraktionsmuster. Patienten mit dilatativer CMP haben anamnestisch keinen Myocardinfarkt und bei der Koronarangiographie wird keine (wirksame) Koronarsklerose festgestellt.

**3. Stand der Therapie**

Patienten mit CMP werden für eine Herztransplantation (HTX) angemeldet und medikamentös mit ACE-Hemmern, ( $\beta$  - Blocker ), Diuretika und Digitalis behandelt.





#### 4. Unbekannte Eigenschaften der Alprostadil (Prostanglandin E1)

In einer vorangegangenen Studie erhielten mehrere Patienten mit Kardiomyopathie, darunter 9 Patienten mit dilatativer CMP vor HTX zusätzlich eine Alprostadil (PGE1) Infusionstherapie.

*Die Einschlusskriterien für die Alprostadil (PGE 1) Studie waren:*

- a. Patienten waren in ihrer täglichen Aktivität schwerwiegend eingeschränkt, obwohl sie maximale oralmedikamentöse Therapie mit ACE-Hemmer (Angiotensin-Converting-Enzym-Antagonisten), Diuretika und Digitalis bekamen.
- b. Die Hämodynamik der Patienten zeigte einen niedrigen Herz-Index ( $< 2.5 \text{ L/min/m}^2$ ) und einen höheren PCWP  $> 20 \text{ mm Hg}$ .
- c. CMP Patienten die einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand aufweisen.

#### **Effekte der Alprostadil (PGE1) Infusionstherapie:**

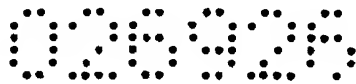
Alprostadil (PGE1) ist ein Medikament, das ursprünglich wegen seinen guten vasodilatatorischen Effekt bei der Behandlung von Neugeborenen mit (anatomischen) kardio - pulmonalen Mißbildungen Verwendung fand. Weiterer eingeschränkter Einsatz von Alprostadil (PGE1) war bei sexuell - erektile Dysfunktion.

Alprostadil(PGE1) gehört aber nicht zur Standardtherapie der Kardiomyopathie, wurde jedoch wegen seiner guten vasodilatatorischen Wirkung bei Patienten mit Kardiomyopathie und erhöhten peripheren Gefäßwiderstand als adjuvante Therapie zur Entlastung der Herzens bis zur Herztransplantation verwendet.

Infusionstherapie erfolgte unter laufender Messung der hämodynamischen Parameter. Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der hämodynamischen Parameter im Vergleich zu den

Ausgangswerten mit gleichzeitiger Verbesserung der klinischen Symptomatik.

In dieser klinisch-experimentellen Studie wurde die Alprostadil (PGE 1) Infusionstherapie bei Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz im Sinne einer pharmakologischen Überbrückung bis zur HTX verwendet. Interessanter Weise wurde bei dieser Gruppe von Patienten eine deutliche Verbesserung des klinischen Zustands mit Steigerung der Auswurfraction und des Herzminutenvolumens verbunden mit einer Reduzierung des NYHA-Stadiums sowie der pathologischen Drücke im Lungenkreislauf.



Die Alprostadil(PGE 1) Infusionen erfolgte über einen zentralen Rechtsherzkatheter (Hickman Katheter) mit einer anfänglichen Dosis von 2.5 ng/kg/min bis die maximal tolerierte Dosis (MTD) erreicht wurde. MTD war die Dosis bei der eine der folgenden Nebenwirkungen auftraten: Muskelschmerzen, Knochenschmerzen, Blutdruckabfall, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Kopfschmerzen oder andere Nebenwirkungen. Unter der MTD ( $29 \pm 1$  ng/kg/min) wurden die hämodynamischen Parameter dokumentiert. Die MTD wurde in den folgenden 12 Stunden halbiert und nach der Stabilisierung der Hämodynamik wurde die Therapie mit einer tragbaren Pumpe zu Hause fortgesetzt.

#### **5. Medikament mit nicht bekannter Wirkung**

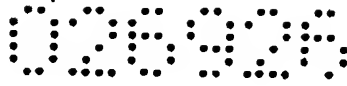
Die Verbesserung der allgemeinen und klinischen Symptomatik unter Alprostadil(PGE1) Therapie wurde ausschließlich auf periphere Vasodilatation zurückgeführt. Eine periphere Vasodilatation wäre aber ebenso mit anderen Medikamenten erreichbar, außerdem kann eine Vasodilatation allein bei Patienten mit reduzierter Herzfunktion einen eher negativen hämodynamischen Effekt verursachen. Der genaue Wirkmechanismus, der zu diesen positiven Effekten bei Alprostadil (PGE 1) Therapie bei Patienten mit Kardiomyopathie führt, war jedoch nicht bekannt.

#### **6. Arbeitshypothese**

Meine Hypothese war es, daß ein solch positiver Effekt nicht nur durch Vasodilatation erklärbar ist. Ich war der Meinung, daß andere funktionelle Prozesse im Sinne einer besseren Versorgung der Herzmuskelzellen verantwortlich sind.

Ein möglicher Grund könnte eine effizientere Sauerstoffversorgung der Myozyten sein. Das würde eine vermehrte Blutzufuhr voraussetzen. Diese ist allerdings von den vorhandenen Gefäßen und Kapillaren abhängig. Dies würde im Falle einer Steigerung der Blutzufuhr nach Alprostadil (PGE 1) Infusionstherapie eine Neovaskularisation bei den behandelten Patienten voraussetzen. Daher war es aus meiner Sicht schlüssig die Gefäßdichte zu ermitteln.

Um die Frage zu beantworten, ob nun die Alprostadil (PGE1) Infusionstherapie mit Neovaskularisation einhergeht, habe ich nach der HTX die explantierten Herzen von Patienten mit vorangegangener Alprostadil (PGE 1) Infusionstherapie und von Patienten ohne Alprostadil (PGE 1) Therapie immunhistochemisch untersucht und die Kapillardichte verglichen:



### 1. Neovaskularisation:

Aus den unten näher ausgeführten Ergebnissen ist ersichtlich, daß überraschend Alprostadil behandelten Patienten Neovaskularisation und damit eine Verbesserung der Organdurchblutung vorhanden ist.

### 2. Im Unterschied zur gängigen Lehrmeinung führt die Alprostadil - Therapie zu

- a) Neuer Kapillarausbildung und Verbesserung der Organdurchblutung.
- b) Gleichzeitig reduziert sie den pathologischen Fibrosegrad.
- c) Einer Ausbildung von Tunnelkapillaren.
- d) Regression der Muskelhypertrophie bei chronischen Herzinsuffizienz.
- e) Die Neovaskularisation geht einher mit vermehrter VEGF produktion und Erhöhung des Herz-Index bei chronischer Herzinsuffizienz.
- f) Erhöhung der Auswurfraction bei chronischen Herzinsuffizienz.
- h) Ausschwemmung von Lungenödemem bei chronischer Herzinsuffizienz.
- i) Senkung der erhöhten Drücke im kleinen Kreislauf bei chronischer Herzinsuffizienz.
- j) Steigerung des Blutdrucks bei chronischer Herzinsuffizienz.
- k) Verbesserung der Atemnot und Rückgang des NYHA-Stadiums.
- m) Abbau der Muskelhypertrophie bei Hypertonie.

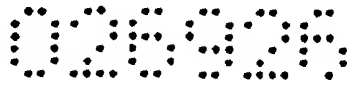
### 3. Gegenstand des Patentes :

Die Verwendung der Alprostadil(PGE 1) Therapie zur Behandlung von:

- a) chronischer Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie
- b) zur Neovaskularisation (Ausbildung von neuen Kapillaren),
- c) Regression der Hypertrophie
- d) Senkung des Fibrosegrades.

### 7. Immunohistochemie

Jedes explantierte Herz wurde in drei gleich große Stücke, nämlich in Spitze, mit dem Teil geteilt. Die Schnittführung erfolgte transmural durch den mittleren Teil des Gewebe für immunohistochemische Analysen wurden sofort nach der Entnahme der üblichen Methode konserviert.



Die Kapillardichte wurde getrennt im Subepicardium, Myocardium und dem Subendocardium bestimmt. Die Bestimmung der Kapillardichte / mm<sup>2</sup>, wurde getrennt anhand anti-CD34, von Willebrand- Factor (vWf), vascular- endothelial-growth-factor (VEGF) , Ki67 (MIB 1) und Sirius Rot, immunhistochemisch gefärbter Paraffinschnitte durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

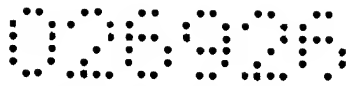
Die Hämodynamischen Parameter vor der Alprostadil (PGE 1) Therapie waren deutlich schlechter in der Alprostadil (PGE 1) Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe bei einem vergleichbaren mittleren Alter (52.33 ± 11.89 versus 49.88 ± 20.42 Jahre, p = 0.76). Die Patienten der Alprostadil (PGE 1) Therapie hatten einen bedeutend niedrigeren CI (1.64 ± 0.29 L/min/m<sup>2</sup> gegenüber 2.39 ± 0.26 L/min/m<sup>2</sup>, p < 0.0001), und einen höheren PVRI (605.11 ± 149.80 dyn x Sek x cm<sup>-5</sup> x m<sup>-2</sup> gegenüber 472.75 ± 84.63 dyn x Sek x cm<sup>-5</sup> x m<sup>-2</sup>, p = 0.0015). Beide Gruppen hatten abgesehen von der Alprostadil (PGE 1) Therapie eine vergleichbare medikamentöse Behandlung.

Die Kapillardichte im Subepicardium, Myocardium und Subendocardium von transmuralen Schnitten wurde quantitativ bestimmt und verglichen. Patienten, die eine Alprostadil (PGE 1) Infusionen bekamen, hatten deutlich mehr Kapillaren (p < 0.001) pro mm<sup>2</sup> verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Kapillardichte im Subepicardium, Myocardium und Subendocardium von der Kontrollgruppe betrug 108.56 ± 91.32 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (sEpi), 542.44 ± 197.20 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (sEndo), und 452.22 ± 101.99 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (Myo) in den drei transmural-Arealen. Alprostadil (PGE 1)-behandelte Patienten hatten im Vergleich dazu ungefähr 50% mehr Kapillaren als die Kontrollgruppe mit 1168.11 ± 165.04 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (sEpi), 1066.00 ± 94.63 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (sEndo), und 974.56 ± 87.12 Kapillaren/mm<sup>2</sup> (Myocard).

### Spezifische immunhistochemische Kapillarmarker

#### CD 34, endothelialer Zellmarker

CD 34 wird von allen Endothelzellen in normalem Gewebe expremiert. CD 34 wird auch zum Nachweis von Endothelien benutzt. Ich fand, daß die Patienten nach Alprostadil (PGE 1) Therapie deutlich mehr anti-CD34 reaktive Endothelien (Abb.1) verglichen zur Kontrollgruppe aufwiesen  
Subepicardium: 599.22 ± 107.17 mm<sup>2</sup> gegenüber 322.89 ± 160.64 mm<sup>2</sup>-Zellen, p < 0.001;  
Myocardium: 482.11 ± 79.86 mm<sup>2</sup> vs. 227.22 ± 49.30 mm<sup>2</sup>, p < 0.0001; Subendocardium: 482.11 ±



79.86 mm<sup>2</sup> gegenüber 227.22 ± 49.30 mm<sup>2</sup>, p <0.0001); Subendocardium: 551.67 ± 107.74 mm<sup>2</sup> gegenüber 308.56 ± 193.86 mm<sup>2</sup>, p <0.01).

#### *Faktor VIII Related Antigen, Von Willebrand Faktor (vWf)*

Als zweiter pan-Endothelzell-spezifischer Marker wurde Factor VIII immunohistochemisch untersucht. Die Herzen von CMP-Patienten nach Alprostadil(PGE 1) Infusionstherapie zeigten bedeutend mehr anti-vWf reaktive Endothelien (Abb.2) verglichen mit der Kontrollgruppe (Subepicardium: 425.56 ± 134.17 mm<sup>2</sup> gegenüber 192.22 ± 77.88 mm<sup>2</sup>-Zellen, p <0.001; Myocardium: 360.00 ± 52.31 mm<sup>2</sup> gegenüber 159.89 ± 61.00 mm<sup>2</sup> p <0.0001; Subendocardium: 408.00 ± 80.00 mm<sup>2</sup> gegenüber 163.89 ± 47.52 mm<sup>2</sup>, p <0.0001)

#### *3-I(Proliferationsmarker)*

3-I (anti-Ki67), ist ein Antikörper der nur mit Zellen reagiert die nicht in G0 des Zellzykluses sind und wird üblicher Weise als Mitose- oder Proliferationsmarker eingesetzt. Er zeigt eine charakteristische, deutliche nukleäre Reaktivität bei mitotischen Zellen.

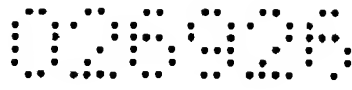
Bei der Gruppe der Patienten mit Alprostadil(PGE 1) Infusionstherapie war die Anzahl der positiven Endothelzellen(Abb.3) in allen Schichten des Herzmuskels deutlich höher verglichen mit der Kontrollgruppe: (Subepicardium: 20.22 ± 4.87 pro mm<sup>2</sup> gegenüber 8.11 ± 2.67 pro mm<sup>2</sup>, p <0.0001; Myocardium: 15.44 ± 4.64 pro mm<sup>2</sup> gegenüber 5.78 ± 2.11 pro mm<sup>2</sup>, p <0.0001; Subendocardium: 17.84 ± 4.23 pro mm<sup>2</sup> gegenüber 6.89 ± 2.21 pro mm<sup>2</sup>).

#### *Anti-VEGF-Immunoreaktivität von Kapillaren*

VEGF ist beschrieben als spezifischer Wachstumsfaktor für Endothelzellen. Alprostadil(PGE 1) behandelte Patienten zeigten bedeutend mehr VEGF-positive Kapillaren/mm<sup>2</sup> als die Kontrollgruppe (Abb.4) in allen drei untersuchten Abschnittsebenen (Subepicardium: 101.2 ± 5.5/mm<sup>2</sup> gegenüber 38.1 ± 7.2 -VEGF positive Zellen/mm<sup>2</sup>, p <0.0001; Myocardium 76.2 ± 4.9/ mm<sup>2</sup> gegenüber 20.6 ± 4.9/ mm<sup>2</sup>, p <0.0001; Subendocardium: 89.1 ± 5.7/ mm<sup>2</sup> gegenüber 27.8 ± 5.1/ mm<sup>2</sup>, p <0.0001).

Damit ist bewiesen, daß im Unterschied zur gängigen Lehrmeinung die Alprostadil (PGE 1) Therapie zu einer Neovaskularisation des Herzens bei Patienten mit CMP führt. Diese Eigenschaften sprechen für

die Alprostadil (PGE 1) Therapie als Standardtherapie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie.



## Patentansprüche

1. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Herzkrankheiten
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von chronischer Herzinsuffizienz und / oder Kardiomyopathie
3. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Neovaskularisation
4. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung des Fibrosegrades
5. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regression der Hypertrophie
6. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Hirninfarkt
7. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von peripheren arteriellen Verschußkrankheiten
8. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von diabetischer Angiopathie
9. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der systemischen Lungenerkrankungen.
10. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von chronischer Niereninsuffizienz
11. Verwendung von Alprostadil zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von chronischer Leberinsuffizienz

026925

## Zusammenfassung

beschrieben wird die Verwendung von *Alprostadi* (Prostaglandin E 1) als Mittel zur weiteren therapeutischen Indikationen in der Behandlung von Herzkrankheiten, insbesondere bei chronischer Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie beziehungsweise zur Anregung der Angiogeneese (Ausbildung von neuen Kapillaren) sowie Regression der Muskelhypertrophie und zur Senkung des Fibrosegrades.

1635/99-10000

### Fibrose und Muskel-Masse (Sirius-Rot-Färbung)

Die Bestimmung des Fibrosegrads und des Herzmuskelanteils bei Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) behandelten Patienten (Abb.5) gegenüber der Kontrollgruppe zeigte, daß die Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) Infusionstherapie den Fibrosegrad bei Patienten mit dilatativen CMP deutlich verringert ( $15.35 \pm 10.32\%$  gegenüber  $6.89 \pm 3.59\%$ ,  $p < 0.05$ , bei einem vergleichbaren Herzmuskelanteil ( $72.69 \pm 5.25\%$  gegenüber  $68.75 \pm 6.23\%$ ).

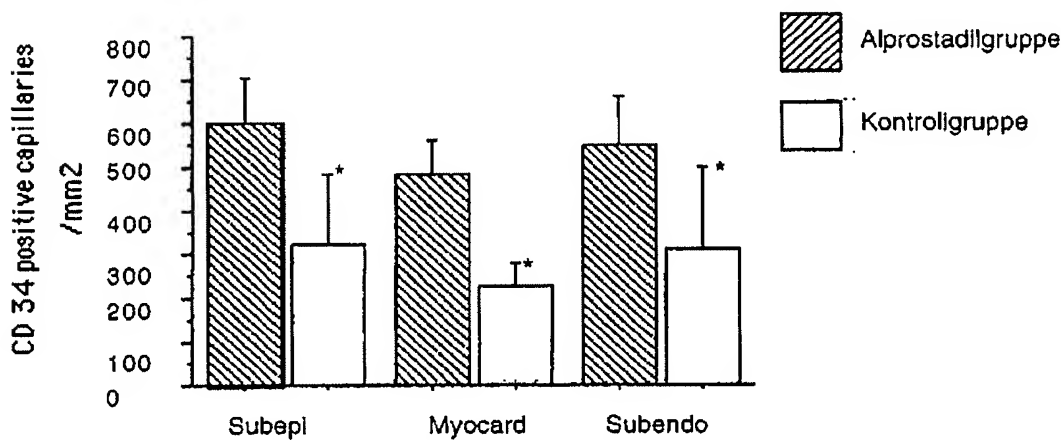


Abbildung 1. CD 34 positive Kapillaren im Subepicardium (Subepi), Myocardium (Myocard) und Subendocardium (Subendo) bei Alprostadil (PGE<sub>1</sub>) behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollengruppe.



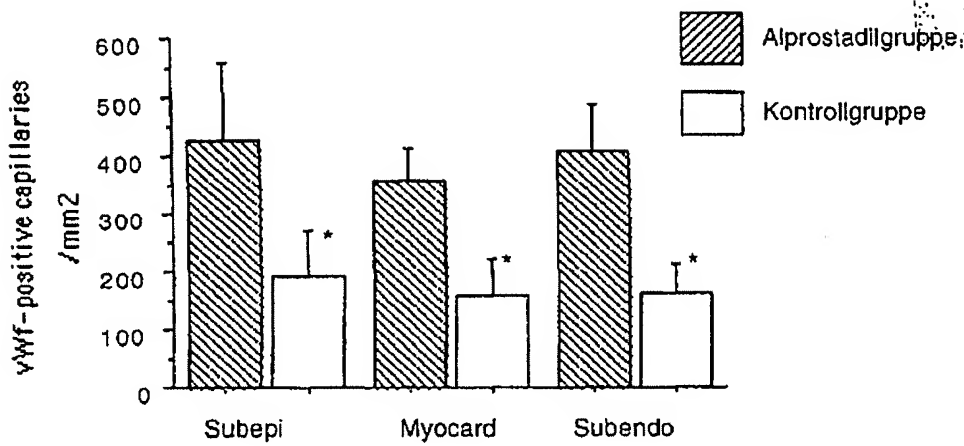


Abbildung 2. vWf- positive Kapillaren im Subepicardium (Subepi), Myocardium (Myocard) and Subendocardium (Subendo) bei Alprostadil (PGE1) behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

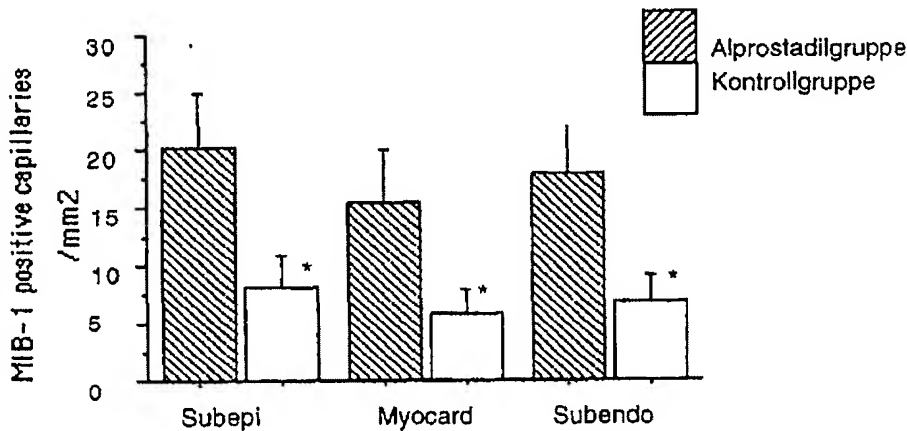


Abbildung 3. MIB-1- positive Endothelzellen im Subepicardium (Subepi), Myocardium (Myocard) and Subendocardium (Subendo) bei Alprostadil (PGE1) behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

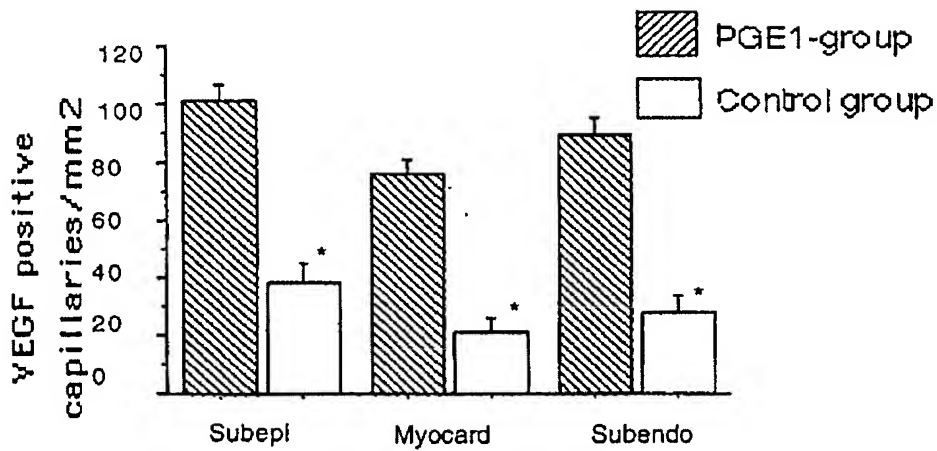


Abbildung 4. VEGF-positive positive Kapillaren im Subepicardium (Subepi), Myocardium (Myocard) und Subendocardium (Subendo) bei Alprostadil (PGE1) behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

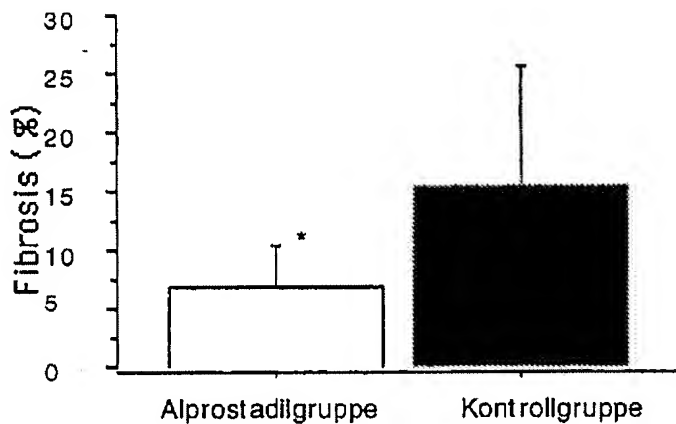


Abbildung 5. Fibrosegrad bei Alprostadil (PGE1) behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

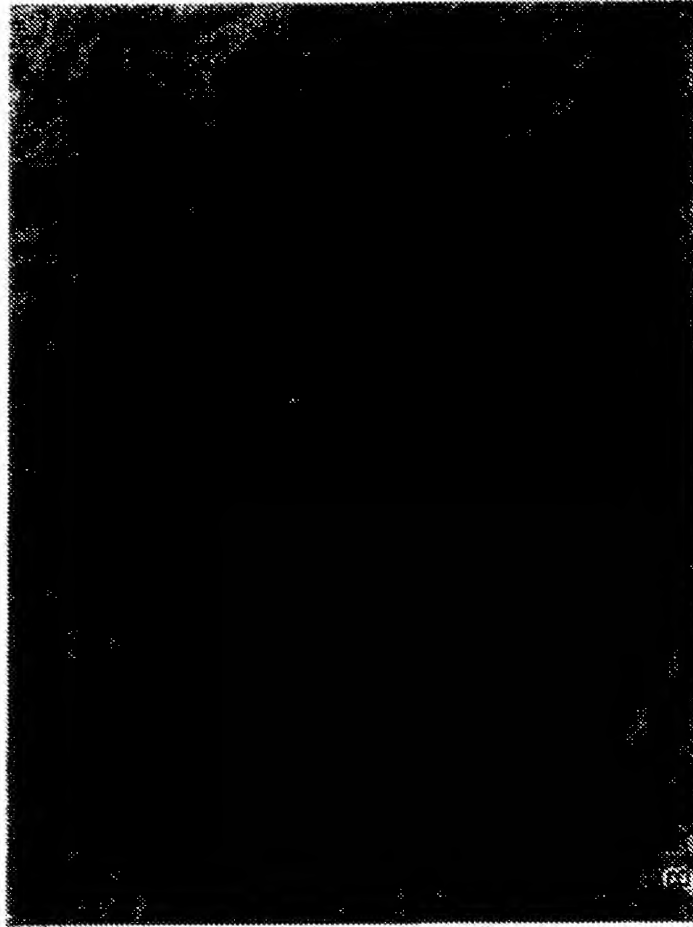


Fig. 7

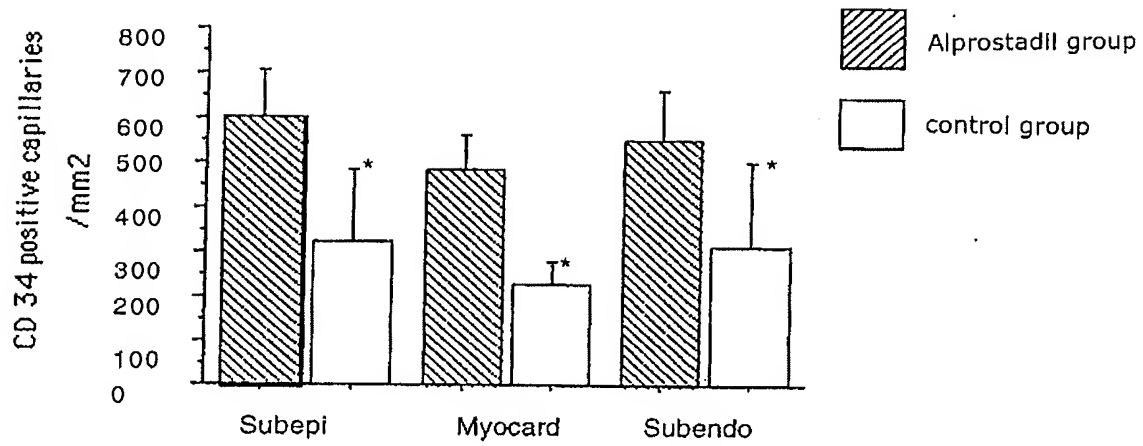


Fig. 1

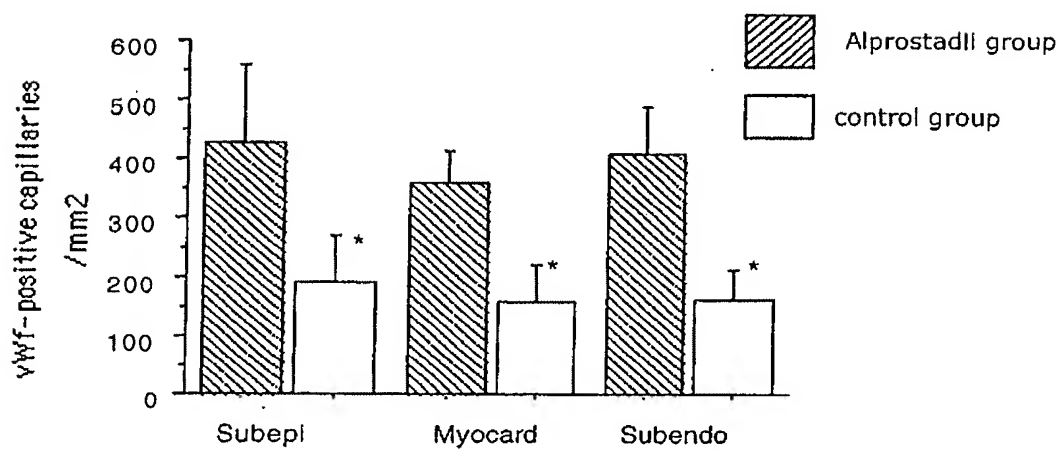


Fig. 2

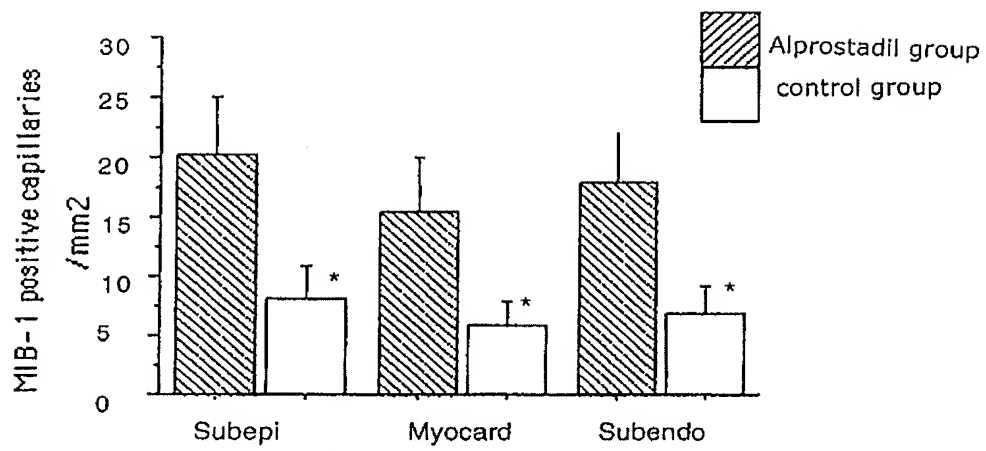


Fig. 3

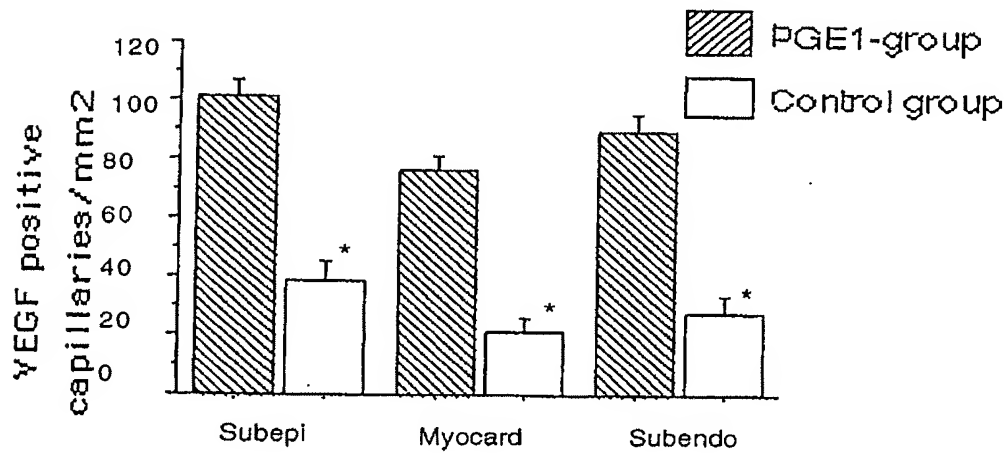


Fig. 4

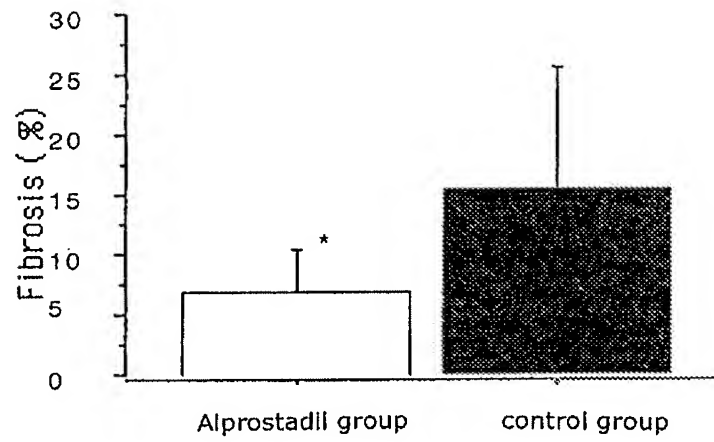


Fig. 5

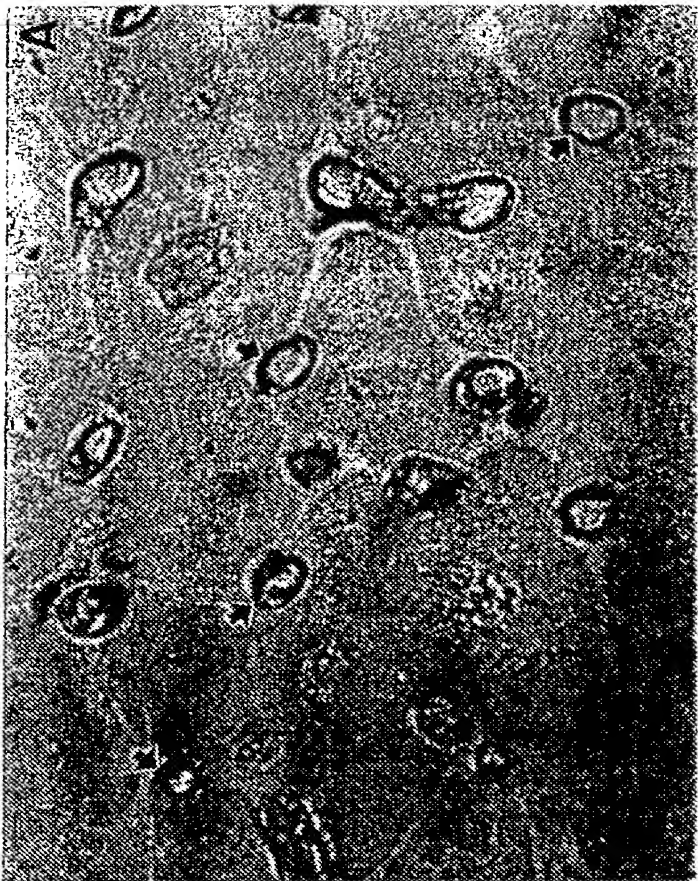
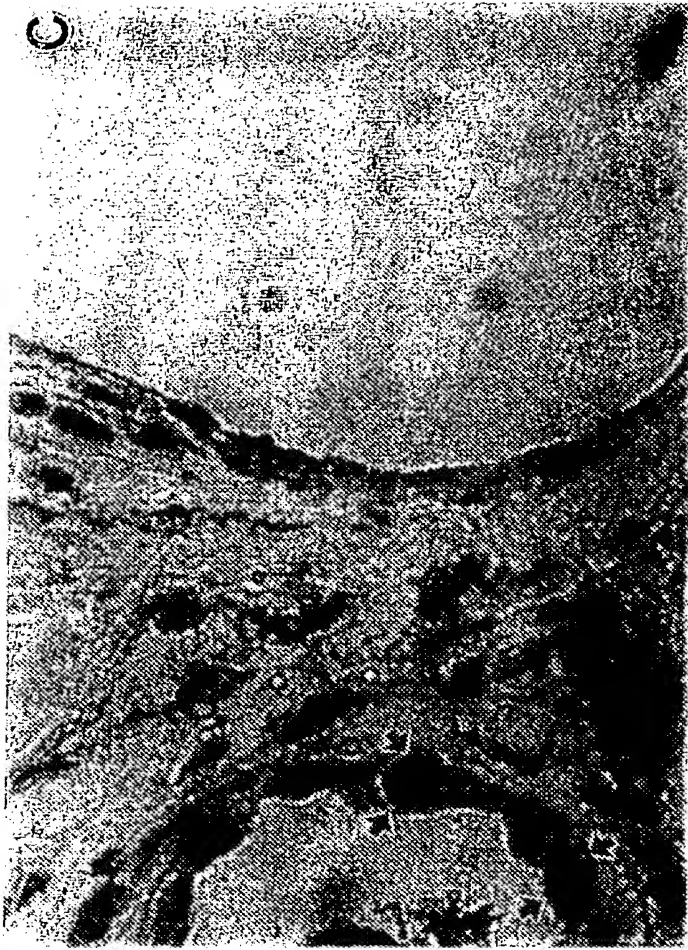


Fig. 6



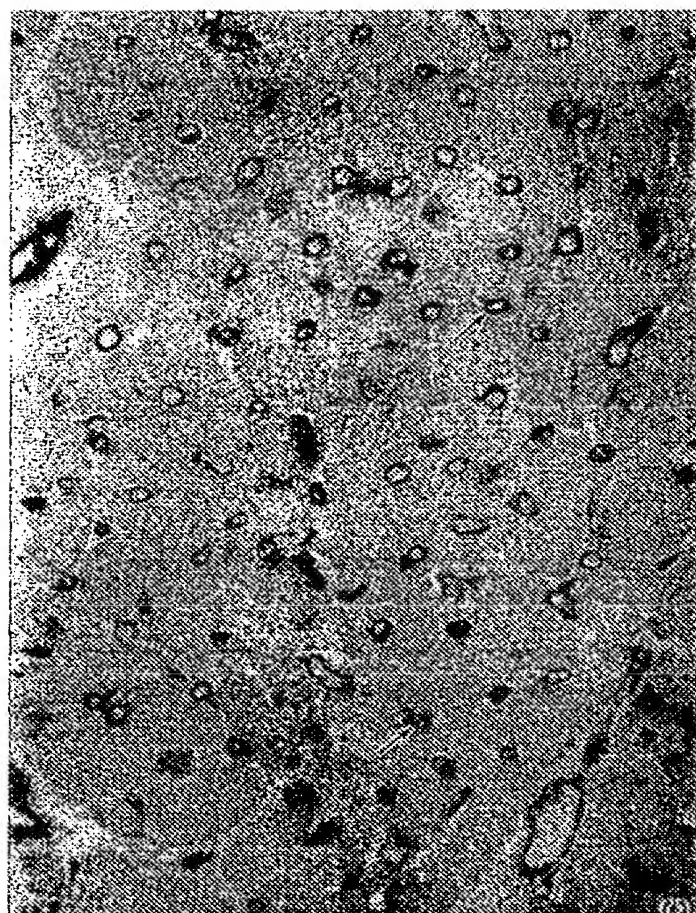
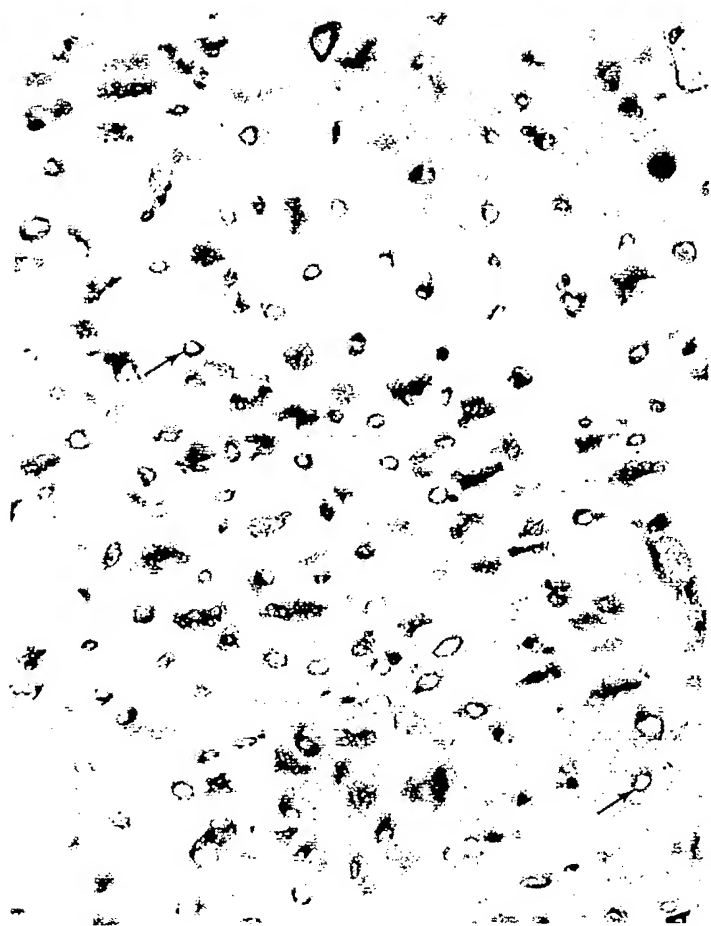
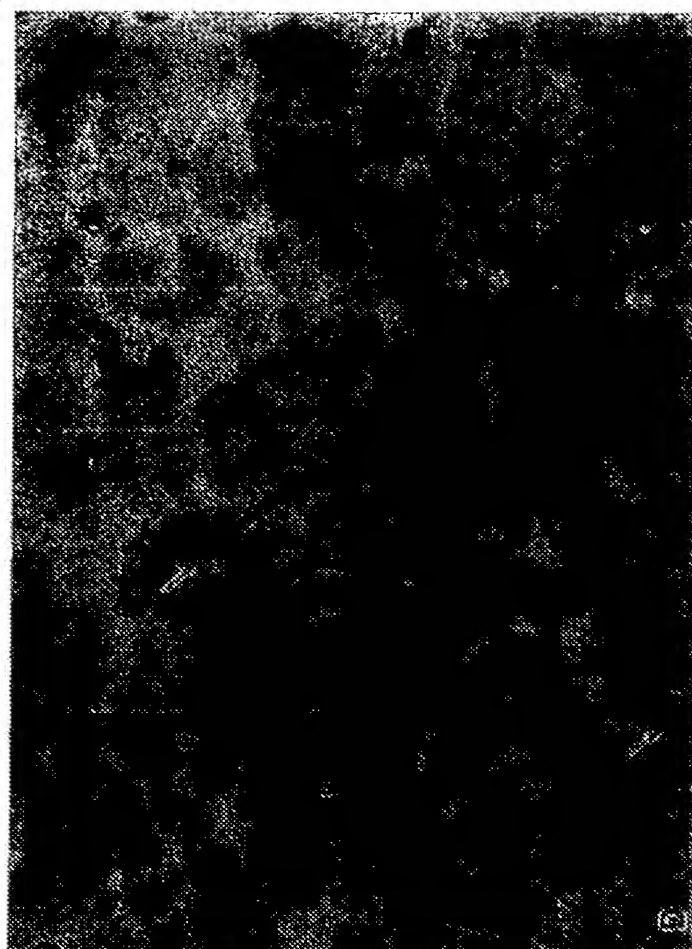


Fig. 8 A-D



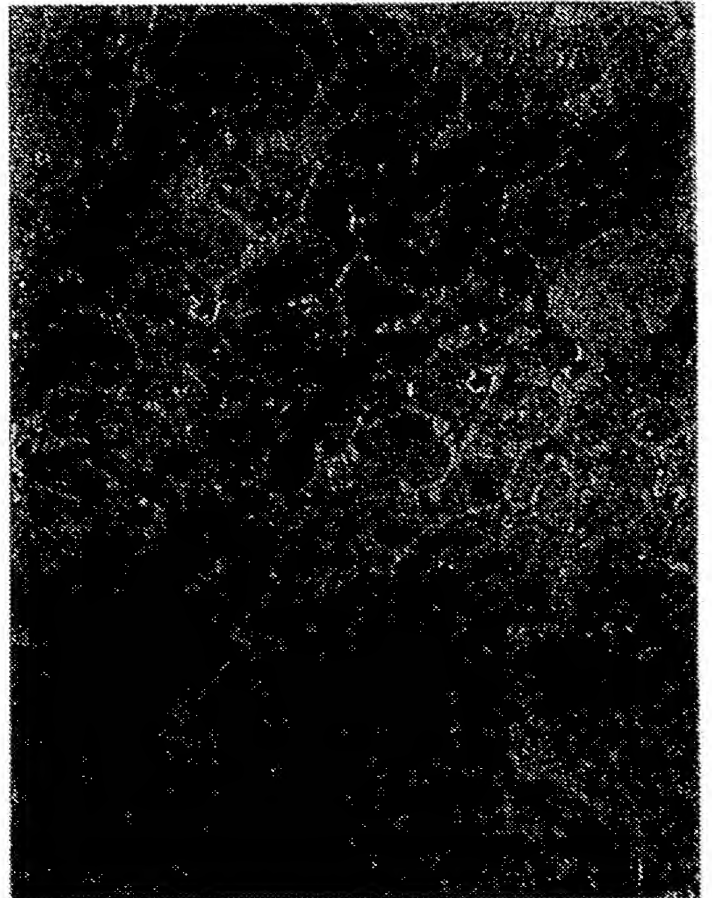
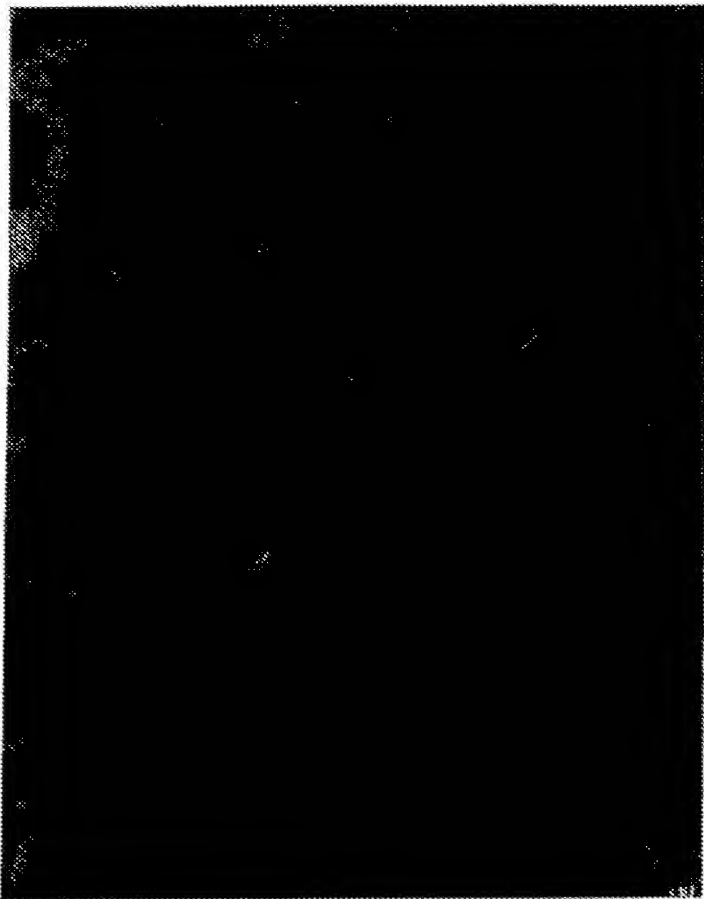
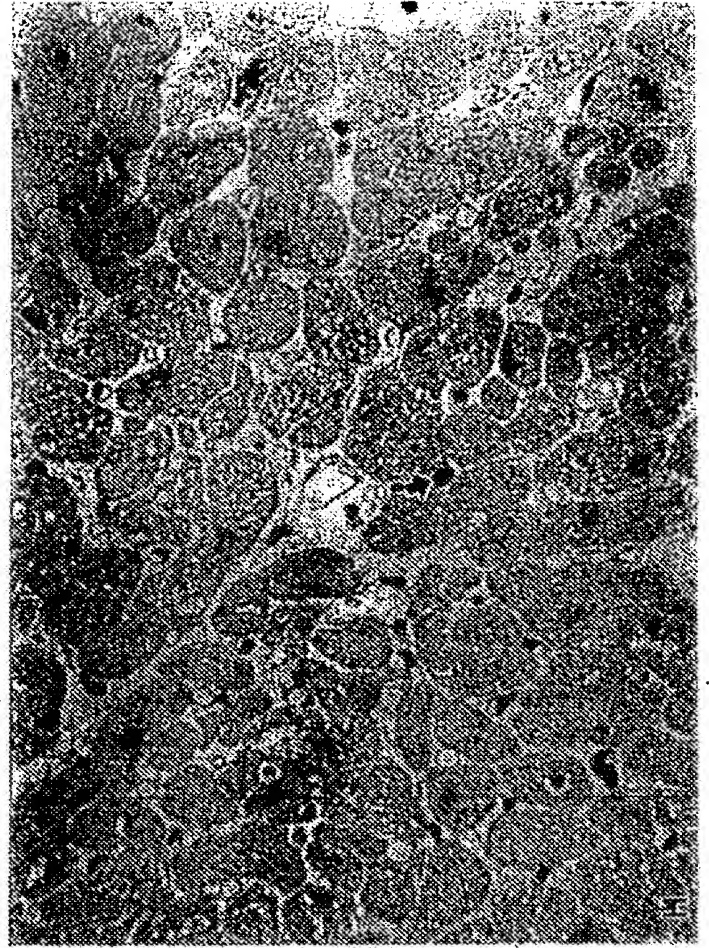
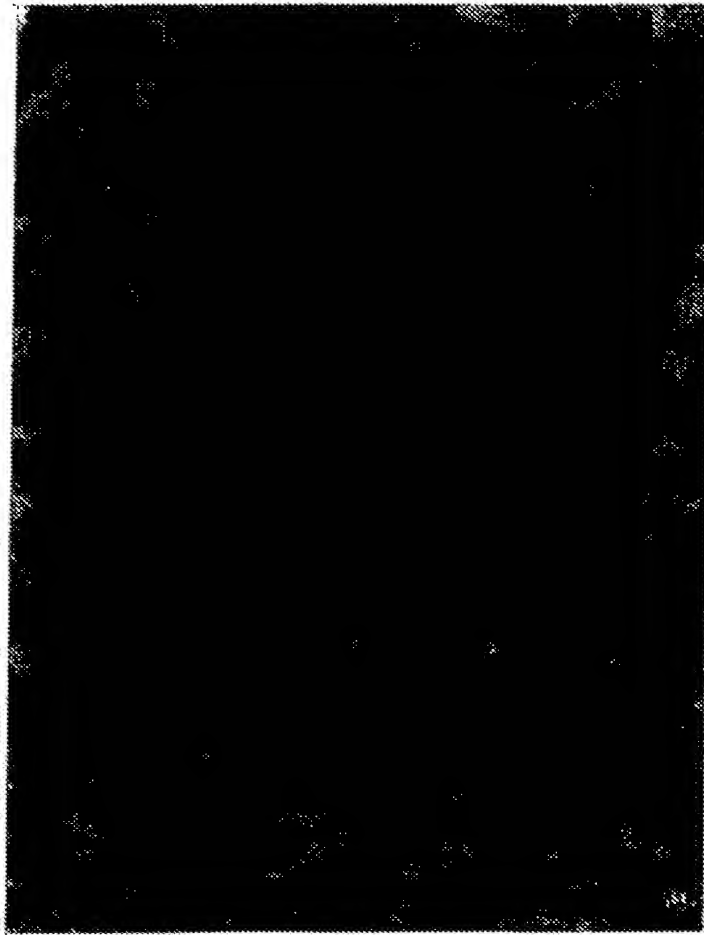


Fig. 8 E - H